

**PENGARUH TINGKAT KONSENTRASI 2,4-D DAN BAP PADA MEDIA MS
TERHADAP INDUKSI KALUS EMBRIOGENIK
TEMULAWAK (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.)**

**EFFECTS OF 2,4-D AND BAP CONCENTRATION LEVELS ON MS MEDIA FOR
EMBRYOGENIC CALLUS INDUCTION OF
JAVA TURMERIC (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.)**

Defi Eka Waryastuti*), Lilik Setyobudi dan Tatik Wardiyati

Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya
Jln. Veteran, Malang 65145, Jawa Timur, Indonesia

*)Email: defiekawaryastuti@gmail.com

ABSTRAK

Temulawak merupakan tanaman berkhasiat yang potensial untuk dikembangkan, namun keterbatasan varietas bibit unggul, rentan penyakit, keragaman kualitas dan produktivitas rendah menyebabkan produksinya menurun, sehingga kebutuhan rimpang temulawak bermutu yang mampu menghasilkan kadar kurkumin tinggi masih belum terpenuhi. Induksi kalus merupakan tahapan penting dalam hibridisasi somatik melalui fusi protoplas untuk menghasilkan tanaman hibrida serta pembentukan embrio dalam embriogenesis somatik. Induksi kalus juga dapat digunakan untuk produksi kurkumin secara massal dalam waktu singkat. Penelitian bertujuan untuk memperoleh konsentrasi 2,4-D dan BAP optimal untuk induksi dan proliferasi kalus embriogenik temulawak yang dilaksanakan pada Mei 2012-Juli 2013 di Laboratorium Kultur Jaringan Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 2 faktor. Faktor 1 yaitu konsentrasi 2,4-D 0 ppm, 0.5 ppm, 1 ppm, 1.5 ppm, 2 ppm dan 2.5 ppm. Faktor 2 yaitu konsentrasi BAP 0 ppm, 0.15 ppm dan 0.3 ppm. Penelitian terdiri dari tiga tahap yaitu 1) Tahap inisiasi tunas *motherstock*, 2) Inisiasi kalus untuk eksplan, 3) Penelitian induksi kalus. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat interaksi antara konsentrasi 2,4-D dengan

BAP. Perlakuan 2,4-D 2 ppm menghasilkan kalus yang baik, banyak, inisiasi cepat dan efisien (optimal) pada BAP 0 ppm. Kalus yang dihasilkan sebanyak 26,18 mg dengan persentase tertinggi yaitu 100%, struktur kalus remah dan berwarna hijau kekuningan terang. Tunas, akar atau daun terbentuk pada perlakuan 2,4-D 0 ppm + BAP 0 ppm; 0.15 ppm; 0.3 ppm. Pemberian 2,4-D yang cukup tinggi mampu menghasilkan induksi dan proliferasi kalus yang optimal pada media rendah BAP.

Kata kunci : Temulawak, *Curcuma*, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 6-Benzyl Amino Purine (BAP), Kalus

ABSTRACT

Java turmeric is useful and potential plant but limited of hybrid variety, vulnerable of disease, variations of quality and low productivity caused decrease on yield, so the needs of good quality rhizomes that can produced high content of curcumin still not fulfilled. Callus induction was an important step in somatic hybridization through protoplasm fusion to create hybrid plant and embryo formation on somatic embryogenesis. Callus induction also used for curcumin production in short term and massively. Research aimed to obtain optimal concentrations of 2,4-D and BAP for embryogenic callus induction and proliferation of java turmeric, conducted at May

2012-July 2013 on Tissue Culture Laboratory, Agriculture Faculty, UB, Malang. Research used Completely Randomized Design with 2 factors. Factor 1: concentrations of 2,4-D 0 ppm, 0.5 ppm, 1 ppm, 1.5 ppm, 2 ppm and 2.5 ppm. Factor 2: concentrations of BAP 0 ppm, 0.15 ppm and 0.3 ppm. Research consist of 3 steps, 1) Initiation *motherstock* shoots, 2) Callus initiation for explant, 3) Callus induction research. The result showed that there was interactions between 2,4-D concentration with BAP. Treatment with 2,4-D 2 ppm produced good quality callus, plenty, fast initiation and efficient (optimal) at BAP 0 ppm. Callus produced by this treatment are 26,18 mg with highest percentage 100%, friable callus structure and light yellowish green colours. Shoots, roots or leaves formed at 2,4-D 0 ppm + BAP 0 ppm; 0.15 ppm; 0.3 ppm. Adding 2,4-D which is high enough can produce optimal callus induction and proliferation on the media with low BAP.

Keywords :Java turmeric, *Curcuma*, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 6-Benzyl Amino Purine (BAP), Callus

PENDAHULUAN

Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) merupakan tanaman berkhasiat asli Indonesia yang potensial untuk dikembangkan. Sebagai obat tradisional temulawak mampu mengatasi penyakit pada liver, pankreas, penambah nafsu makan, menurunkan kolesterol, anti inflamasi, anti tumor dan dimanfaatkan juga untuk bahan kosmetika serta makanan/minuman (Wardiyati *et al.*, 2008; Raharjo dan Rostiana, 2003 dan Pitasawat *et al.*, 2003).Perkiraan kebutuhan rimpang di tahun 2008 mencapai 37.568 ton, sedangkan produksinya mengalami penurunan dari 36.826 ton di tahun 2009 menjadi 26.671 ton di tahun 2010 (Pribadi, 2009). Permintaan yang tinggi tidak diimbangi dengan ketersediaan rimpang yang memadai. Hal ini dikarenakan keterbatasan varietas bibit unggul, rentan penyakit, keragaman kualitas dan produktivitas rendah menyebabkan produksinya menurun, sehingga kebutuhan rimpang temulawak bermutu yang mampu mengha-

silkan kadar kurkumin tinggi masih belum terpenuhi. Produksi bibit hibrida secara massal dan dalam waktu singkat tidak bisa dilakukan secara konvensional karena adanya hambatan inkompatibilitas pada temulawak. Oleh karena itu, dibutuhkan alternatif lain yaitu melalui teknik kultur jaringan (nonkonvensional) dengan fusi protoplas ataupun embriosomatik.

Induksi kalus merupakan tahapan penting dalam hibridisasi somatik melalui fusi protoplas untuk menghasilkan tanaman hibrida serta pembentukan embrio dalam embriogenesis somatik. Induksi kalus juga dapat digunakan untuk produksi kurkumin secara massal dalam waktu singkat. Kalus yang remah dapat distimulasi dengan konsentrasi auksin yang lebih tinggi dibandingkan sitokinin. Induksi kalus sangat dipengaruhi oleh komposisi media, kondisi lingkungan kultur, zat pengatur tumbuh, jenis dan genotipe eksplan (Gultom *et al.*, 2013; Seswita, 2010; Djajanegara, 1996).

Menurut Kristina *et al.* (2008), kalus dapat dipacu pembentukan dan pertumbuhannya dengan pemakaian ZPT 2,4-D dan sering pula dikombinasikan dengan sitokinin. Konsentrasi auksin 2,4-D yang dibutuhkan untuk tanaman monokotil berkisar antara 2 ppm–5 ppm (Katuuk, 1989 dan Wattimena, 1992 dalam Yuanti, 2004). Auksin 2,4-D merupakan auksin sintetik kuat yang berfungsi memacu pembentukan kalus, pemanjangan/pertumbuhan sel, inisiasi akar dan induksi embriogenesis somatik (Damayanti *et al.*, 2005). Penambahan sitokinin BAP berfungsi untuk memacu pembelahan sel, jaringan, organogenesis, induksi pembentukan tunas dan proliferasi tunas aksilar (Damayanti *et al.*, 2005 dan Siti *et al.*, 2008). Penelitian bertujuan untuk memperoleh konsentrasi 2,4-D dan BAP yang optimal untuk induksi dan proliferasi kalus embriogenik temulawak pada media MS.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang pada bulan Mei 2012 hingga Juli 2013. Penelitian terdiri dari tiga

tahap yaitu (1) tahap persiapan meliputi inisiasi, proliferasi, pemeliharaan tunas steril, (2) tahap inisiasi kalus untuk eksplan, (3) tahap penelitian percobaan induksi kalus dengan penambahan 2,4-D dan BAP. Eksplan yang digunakan untuk proliferasi temulawak steril adalah tunas rimpang, sedangkan eksplan untuk kalus bahan eksplan adalah tunas meristem dari temulawak steril lalu eksplan yang digunakan untuk penelitian berasal dari kalus hasil perbanyakan tahap 2 yang memiliki pertumbuhan baik. Media yang digunakan yaitu MS (Murashige dan Skoog). ZPT yang digunakan adalah 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), BAP (6-benzyl amino purine). Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial terdiri dari 2 faktor yaitu faktor I : konsentrasi 2,4-D 0 ppm (A0); 0,5 ppm (A1); 1 ppm (A2); 1,5 ppm (A3); 2 ppm (A4); 2,5 ppm (A5) dan faktor II : konsentrasi BAP 0 ppm (B0); 0,15 ppm (B1); 0,3 ppm (B2) dan ulangan sebanyak 3 kali. Hasil dianalisa secara deskriptif dan analisis ragam (ANOVA) dengan uji F 5% dan uji lanjut BNT 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase Eksplan Hidup, Mati dan Terkontaminasi

Perlakuan yang diuji menghasilkan rerata persentase eksplan hidup yang tinggi yaitu pada interaksi perlakuan BAP 0 ppm dengan 2,4-D 0; 1,5; 2; 2,5 ppm dan interaksi perlakuan BAP 0,15 ppm dengan 2,4-D 0; 0,5 ppm serta interaksi perlakuan BAP 0,3 ppm dengan 2,4-D 0; 1; 2,5 ppm. Hasil ini tidak berbeda nyata dengan perlakuan BAP 0 ppm+2,4-D 0,5 ppm; BAP 0,15 ppm+2,4-D 1 ppm atau 2,5 ppm dan BAP 0,3 ppm+2,4-D 2 ppm. Persentase eksplan hidup yang rendah dihasilkan oleh perlakuan BAP 0,15 ppm+2,4-D 1,5 ppm dan tidak berbeda dengan BAP 0,3 ppm+2,4-D 1,5 ppm (Tabel 1). Eksplan yang hidup ditandai dengan eksplan yang segar, berwarna terang dan tidak mengalami pencoklatan (Fauza *et al.*, 2004). Perlakuan tanpa 2,4-D baik dengan penambahan BAP atau tidak, menghasilkan daya hidup yang tinggi karena auksin endogen yang terdapat pada

jaringan eksplan sudah cukup berpengaruh dan ditambah dengan BAP menyebabkan sel terus aktif membelah.

Eksplan yang mati ditandai dengan pencoklatan dan gosong pada permukaannya (Gambar 1). Perlakuan dengan tingkat kematian lebih tinggi adalah 2,4-D 1,5 ppm+BAP 0,15 ppm dan 2,4-D 1,5 ppm+BAP 0,3 ppm (Tabel 2). Perlakuan tanpa 2,4-D tidak menimbulkan senyawa toksik berupa fenol yang mampu menghambat atau bahkan menyebabkan kematian eksplan atau memicu browning (Rismayani *et al.*, 2010). Menurut Trigiano and Gray (2004), 2,4-D tergolong auksin eksogen kuat yang dapat bersifat racun karena dapat menstimulasi produksi gas ethylene. Perlakuan penambahan 2,4-D dan BAP pada media tidak menunjukkan adanya interaksi dan pengaruh terhadap kontaminasi eksplan. Kontaminasi eksplan yang terjadi disebabkan karena kontaminan dari eksplan itu sendiri, organisme kecil yang masuk ke dalam media, bakteri dan fungi.

Waktu Inisiasi Kalus

Munculnya kalus pada eksplan ditandai dengan pembengkakan atau munculnya jaringan berwarna putih bening seperti titik-titik air/lendir pada bekas irisan eksplan dan sayatan di permukaan eksplan yang kemudian berkembang menjadi bulatan-bulatan kecil yang jelas dan agregat kalus. Pemberian 2,4-D dan BAP pada media memberikan pengaruh interaksi yang nyata terhadap inisiasi kalus.

Perlakuan 2,4-D 2,5 ppm dengan BAP 0 ppm menghasilkan rata-rata saat inisiasi kalus dengan waktu tercepat yaitu 3,00 HSI bila dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Perlakuan dengan penambahan 2,4-D 2 ppm yang dikombinasikan dengan BAP 0; 0,15; 0,3 menghasilkan saat inisiasi yang tidak berbeda yaitu 8 HSI, 8,33 HSI, dan 6 HSI. Sedangkan waktu inisiasi kalus yang lebih lama terjadi pada perlakuan 2,4-D 1 ppm+BAP 0,15 ppm yang tidak berbeda dengan 2,4-D 0,5 ppm+BAP 0,3 ppm.

Berdasarkan Tabel 3 dapat disimpulkan bahwa penambahan 2,4-D yang tinggi yaitu 2 ppm dan 2,5 ppm baik yang diikuti dengan penambahan BAP 0,15 ppm

atau 0,3 ppm menghasilkan rerata saat inisiasi kalus yang cepat. Sedangkan perlakuan dengan konsentrasi 2,4-D yang rendah akan mengakibatkan inisiasi kalus semakin

lambat. Yelnitis (2012), mengatakan bahwa pembentukan kalus dari eksplan daun ramin membuktikan bahwa semakin tinggi

Tabel 1 Persentase Eksplan Hidup pada Berbagai Konsentrasi 2,4-D dan BAP pada 8 MSI

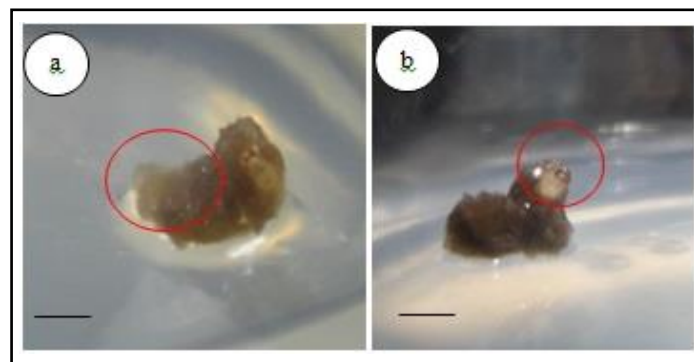
Perlakuan	Persentase eksplan hidup (%)		
	Konsentrasi BAP (ppm)		
Konsentrasi 2,4-D (ppm)	0 (B ₀)	0,15 (B ₁)	0,3 (B ₂)
0 (A ₀)	100,00 d	100,00 d	100,00 d
0,5 (A ₁)	83,33 cd	91,67 d	66,67 bc
1,0 (A ₂)	66,67 bc	83,33 cd	100,00 d
1,5 (A ₃)	100,00 d	41,67 a	50,00 ab
2,0 (A ₄)	100,00 d	66,67 bc	83,33 cd
2,5 (A ₅)	100,00 d	83,33 cd	91,67 d
BNT 5%	24,56		
KK (%)	17,70		

Keterangan: Bilangan yang didampingi huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) 5%; MSI= Minggu Setelah Inokulasi.

Tabel 2 Persentase Eksplan Mati pada Berbagai Konsentrasi 2,4-D dan BAP pada 8 MSI

Perlakuan	Persentase eksplan mati (%)		
	Konsentrasi BAP (ppm)		
Konsentrasi 2,4-D (ppm)	0 (B ₀)	0,15 (B ₁)	0,3 (B ₂)
0 (A ₀)	0,00 a	0,00 a	0,00 a
0,5 (A ₁)	16,67 abc	0,00 a	33,33 bcd
1,0 (A ₂)	33,33 bcd	16,67 abc	0,00 a
1,5 (A ₃)	0,00 a	58,33 d	50,00 d
2,0 (A ₄)	0,00 a	33,33 bcd	16,67 abc
2,5 (A ₅)	0,00 a	8,33 ab	8,33 ab
BNT 5%	22,17		
KK (%)	89,24		

Keterangan: Bilangan yang didampingi huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) 5%; MSI= Minggu Setelah Inokulasi.



Gambar 1 Inisiasi Kalus a) Kalus yang tumbuh pada perlakuan 2,4-D 2,5 ppm + BAP 0 ppm (A₅B₀) pada 7 HSI dan b) Kalus embrio yang tumbuh pada perlakuan 2,4-D 0,15 ppm + BAP 0,15 ppm (A₂B₁) pada 60 HSI. (Bar : 2 mm)

Tabel 3 Rerata saat Inisiasi Kalus Akibat Interaksi Berbagai Konsentrasi 2,4-D dan BAP pada Media MS

Perlakuan	Saat inisiasi kalus (HSI)		
	Konsentrasi BAP (ppm)		
Konsentrasi 2,4-D (ppm)	0 (B ₀)	0,15 (B ₁)	0,3 (B ₂)
0 (A ₀)	13,33 ef	12,67 de	14,33 ef
0,5 (A ₁)	9,67 cde	13,50 ef	22,50 fg
1,0 (A ₂)	13,33 def	24,33 g	9,67 cde
1,5 (A ₃)	9,67 cde	13,33 de	6,67 bc
2,0 (A ₄)	8,00 bc	8,33 bcd	6,00 b
2,5 (A ₅)	3,00 a	6,50 bc	7,17 bc
BNT 5%	0,20		
KK (%)	12,12		

Keterangan: Bilangan yang didampingi huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) 5%; HSI = hari setelah inokulasi.

konsentrasi 2,4-D yang digunakan, induksi kalus semakin cepat terjadi karena 2,4-D lebih mudah berdifusi ke dalam jaringan tanaman akibat adanya luka irisan sehingga 2,4-D yang ditambahkan akan membantu auksin endogen untuk menstimulasi atau merangsang pembelahan sel terutama sel disekitar area luka.

Keberhasilan eksplan dalam merespon komposisi media untuk menginisiasi kalus juga tergantung pada kondisi eksplan. Bakti (2005) menyatakan bahwa musim ketika eksplan diambil, kualitas tanaman keseluruhan, kondisi aseptik media dan eksplan, ukuran eksplan dan umur fisiologis tanaman mempengaruhi keberhasilan kultur. Keberhasilan untuk menginduksi kalus lebih besar bila eksplan yang digunakan bersifat meristematik (aktif membelah). Gambar eksplan yang mengalami inisiasi tercepat dan terlama dapat dilihat pada Gambar 1 dan Tabel 3.

Persentase Eksplan Membentuk Kalus Embriogenik

Pengaruh interaksi yang nyata ditunjukkan antara konsentrasi 2,4-D dengan konsentrasi BAP terhadap persentase eksplan yang mampu membentuk kalus embriogenik. Persentase eksplan yang membentuk kalus embriogenik karena pengaruh konsentrasi hormon 2,4-D dengan hormon BAP menunjukkan bahwa rata-rata pembentukan kalus embriogenik yang tinggi terdapat pada perlakuan tanpa penambahan BAP yang dikombinasikan dengan 2,4-D 0 ppm atau 2 ppm serta 2,4-D 2,5 ppm +

BAP 0,3 ppm yaitu sebesar 100%. Pada perlakuan tanpa penambahan BAP (0 ppm) dengan berbagai tingkat konsentrasi 2,4-D (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5) ppm menghasilkan persentase eksplan membentuk kalus embriogenik yang tidak berbeda nyata antar perlakuan. Hal yang sama juga terjadi pada perlakuan penambahan 2,4-D 2,5 ppm dan 2,4-D 0 ppm yang dikombinasikan dengan BAP 0,3 ppm atau 0,15 ppm maupun tanpa BAP yang hasil persentase kalus embriogeniknya tidak berbeda nyata antar perlakuan. Sedangkan perlakuan dengan penambahan konsentrasi 2,4-D 1,5 ppm + BAP 0,15 ppm hanya mampu menghasilkan persentase kalus embriogenik yang rendah sebesar 25%.

Pertumbuhan kalus embriogenik membutuhkan auksin dengan konsentrasi tinggi dan sitokinin yang rendah (Dodds and Roberts, 1984). Pada tanaman monokotil membutuhkan auksin berkisar 2 ppm-5 ppm (Yuanty, 2004). Pembentukan kalus embriogenik temulawak yang tergolong tanaman monokotil tidak terlalu dipengaruhi oleh kadar sitokinin (BAP) yang ditambahkan pada media sesuai dengan pernyataan George (1993), untuk menginduksi kalus tanaman monokotil peranan sitokinin tidak terlalu penting. Pemberian hormon eksogen akan menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan sintesa protein dan permeabilitas sel terhadap air, serta melunakkan dinding sel yang diikuti dengan menurunnya tekanan dinding sel sehingga air dapat masuk ke dalam sel dan sel akan membesar dan memanjang (Sitinjak *et al*, 2006).

Tabel 4 Rerata Persentase Eksplan Membentuk Kalus Embriogenik Akibat Interaksi Perlakuan Taraf Konsentrasi 2,4-D dan BAP

Perlakuan	Persentase kalus yang terbentuk (%)		
	Konsentrasi BAP (ppm)		
Konsentrasi 2,4-D (ppm)	0 (B ₀)	0,15 (B ₁)	0,3 (B ₂)
0 (A ₀)	100,00 e	83,33 cde	83,33 cde
0,5 (A ₁)	75,00 cde	83,33 cde	58,33 bc
1,0 (A ₂)	75,00 cde	66,67 bcd	91,67 de
1,5 (A ₃)	91,67 de	25,00 a	41,67 ab
2,0 (A ₄)	100,00 e	58,33 bc	75,00 cde
2,5 (A ₅)	91,67 de	83,33 cde	100,00 e
BNT 5%	28,73		
KK (%)	22,57		

Keterangan: Bilangan yang didampingi huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) 5%.

Pembentukan kalus embriogenik yang terbaik antara lain terjadi pada A₄B₀ dan A₅B₂ yang mengandung 2,4-D sebanyak 2 ppm dan 2,5 ppm (Tabel 4). Hal ini sesuai dengan Ariati *et al.* (2012) yang dalam penelitiannya memperoleh media terbaik untuk menginduksi kalus kakao dalam media MS + 2,4-D 2 ppm + air kelapa 15%. Selanjutnya Yuanti (2004) memperoleh bahwa perlakuan terbaik untuk produksi kalus pada temu putih adalah MS + 2,4-D 2,5 ppm + BAP 0,1 ppm. Sedangkan pada percobaan Bakti (2005), kalus embriogenik jahe diperoleh pada perlakuan 1,5-2 ppm 2,4-D dengan ciri-ciri kalus kompak, noduler, putih pucat dengan pertumbuhan lambat. Pembentukan kalus dan perkembangan eksplan pada setiap perlakuan dapat dilihat pada Gambar 2.

Bobot Segar Kalus

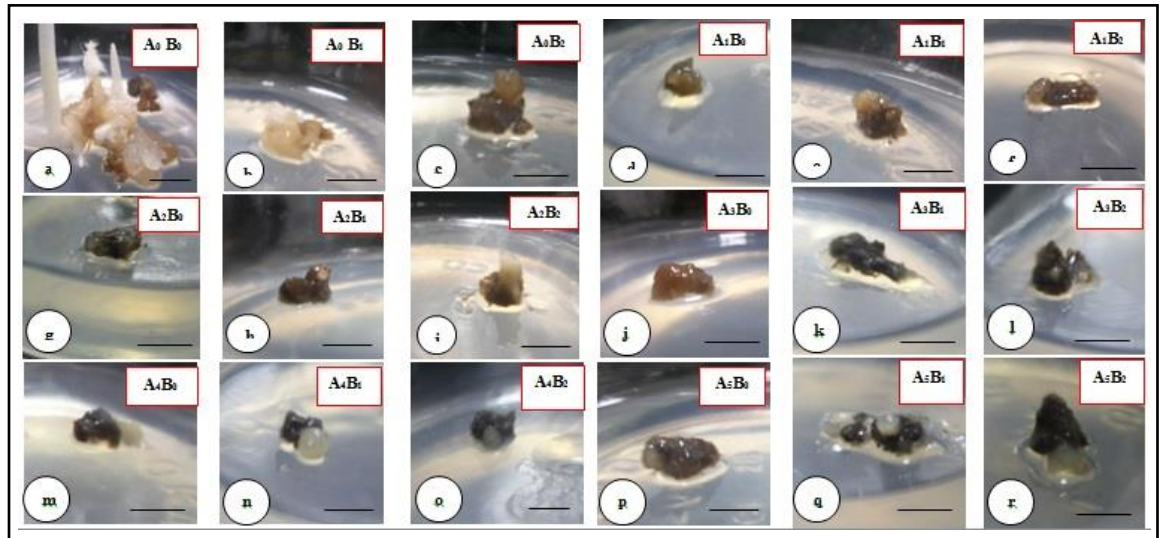
Perlakuan 2,4-D 2,5 ppm, 2 ppm, 1,5 ppm, 1 ppm, 0,5 ppm maupun 0 ppm tanpa disertai dengan pemberian BAP menghasilkan bobot segar kalus yang lebih banyak dibandingkan dengan kombinasi perlakuan 2,4-D serupa dengan disertai penambahan BAP sebanyak 0,15 ppm maupun 0,3 ppm. Perlakuan yang menghasilkan bobot segar kalus tertinggi adalah perlakuan tanpa zat pengatur tumbuh yaitu 126,3 mg. Kemudian perlakuan yang tinggi berikutnya adalah A₀B₁ yang tidak berbeda dengan perlakuan A₀B₂, A₄B₀, A₅B₁ dan A₅B₂ (Tabel 5). Kalus yang dihasilkan pada perlakuan tersebut cukup banyak karena adanya penambahan auksin 2,4-D yang dapat

memicu pertumbuhan dan proliferasi kalus embriogenik pada eksplan. Selain itu kalus yang dihasilkan juga kompak dan berbentuk bulat globular (embrio) dengan butiran yang cukup besar.

Sedangkan perlakuan dengan penambahan 2,4-D 0,5 ppm + BAP 0,3 ppm (A₁B₂) menghasilkan rerata bobot segar kalus terendah yaitu sebesar 5,03 mg (Tabel 5). Minimnya bobot segar kalus yang terbentuk pada perlakuan ini lebih banyak disebabkan karena eksplan hanya menghasilkan kalus berupa lendir dan berair yang belum berkembang serta akibat eksplan browning. Eksplan yang mengalami mati fisiologis dan browning mengakibatkan kematian jaringan sehingga tidak mampu memproduksi kalus. Lizawati (2012), mengatakan bahwa peristiwa browning pada kalus akibat adanya metabolisme senyawa fenol yang bersifat toksik dan dapat menghambat pertumbuhan atau bahkan menyebabkan kematian jaringan. Hal ini merupakan tanda terjadinya kemunduran fisiologis eksplan dan juga menandakan terjadinya sintesis senyawa fenol dalam botol kultur.

Warna dan Struktur Kalus

Kalus embriogenik yang dihasilkan memiliki struktur yang remah dan juga kompak tergantung pada perkembangan eksplan. Selain itu eksplan juga membentuk embrio somatik globular. Berdasarkan Yelnititis dan Komar (2010) kalus embriogenik mempunyai struktur friable hingga kompak, noduler dan berwarna pu-



Gambar 2 Perkembangan eksplan membentuk kalus embriogenik setiap perlakuan pada 8 MSI; Keterangan: a) kalus embriogenik, remah, granular, bertunas dan berakar; b) kalus embriogenik, remah, granular, embrio globular dan berakar; c) kalus embriogenik, kompak, embrio bentuk hati; d) kalus embriogenik, remah, nodular, granular; e, f, h) kalus embriogenik, kompak, nodular, membentuk embrio globular; g) kalus embriogenik, nodular; i) kalus embriogenik, kompak, granular, membentuk embrio torpedo; j) kalus lembek, berlendir, nonembriogenik; k) eksplan browning, kalus berlendir, nonembriogenik; l) kalus embriogenik, remah, membentuk embrio globular; m, n, o, p, q) kalus embriogenik, remah, nodular, membentuk embrio globular besar; r) kalus embriogenik, remah, granular, membentuk embrio. Keterangan : A₀ = 0 ppm 2,4-D; A₁ = 0,5 ppm 2,4-D; A₂ = 1 ppm 2,4-D; A₃ = 1,5 ppm 2,4-D; A₄ = 2 ppm 2,4-D; A₅ = 2,5 ppm 2,4-D; B₀ = 0 ppm BAP; B₁ = 0,15 ppm BAP; B₂ = 0,3 ppm BAP. Bar : 1 cm

Tabel 5 Rata-rata Bobot Segar Kalus Akibat Interaksi Pemberian Taraf Konsentrasi 2,4-D dengan Konsentrasi BAP pada Akhir Pengamatan (60 HSI)

Perlakuan	Bobot segar kalus (mg)		
	Konsentrasi BAP (ppm)		
Konsentrasi 2,4-D (ppm)	0 (B ₀)	0,15 (B ₁)	0,3 (B ₂)
0 (A ₀)	126,30 i	30,12 h	26,38 gh
0,5 (A ₁)	11,96 cde	17,64 efg	5,03 a
1,0 (A ₂)	7,37 abc	7,47 abc	15,37 def
1,5 (A ₃)	10,57 bcde	6,60 ab	11,13 cde
2,0 (A ₄)	26,18 gh	15,50 def	9,55 bcd
2,5 (A ₅)	9,75 bcd	19,53 fgh	20,34 fgh
BNT 5%		0,21	
KK (%)		11,20	

Keterangan: Bilangan yang didampingi huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) 5%; HSI= hari setelah inokulasi.

tih atau kekuningan. Selanjutnya sel embriogenik juga dicirikan oleh bentuknya yang bulat, hal ini sesuai dengan hasil pengamatan, sitoplasma padat sehingga sel berwarna lebih gelap dibanding sel non-embriogenik, vakuola sangat sedikit, ukuran

sel kecil, inti besar, dinding sel tipis (Bakti, 2005). Penelitian Rostiana dan Syahid (2008) tentang embriogenesis jahe menggunakan eksplan meristem mengungkapkan bahwa induksi kalus embriogenik menggunakan media MS dengan tambahan 2,4-D

Tabel 6 Rata-Rata Hasil Pembentukan Organ pada Perlakuan Tanpa 2,4-D

Parameter Hasil (x±SD)	Perlakuan		
	2,4-D 0 ppm+BAP 0 ppm	2,4-D 0 ppm+BAP 0,15 ppm	2,4-D 0 ppm+BAP 0,3 ppm
Panjang tunas (cm)	3,50±4,44	-	-
Panjang akar (cm)	9,23±3,00	6,17±7,68	0,53±0,47
Panjang daun (cm)	0,33±0,57	-	-
Saat inisiasi tunas (HSI)	9,00±7,79	-	-
Saat inisiasi akar(HSI)	20,17±3,21	29,17±6,11	27,17±4,07
Saat inisiasi daun(HSI)	9,00±7,79	-	-
Jumlah tunas	2,00±2,00	-	-
Jumlah akar	8,33±0,58	6,00±5,20	2,00±1,73
Jumlah daun	0,67±1,15	-	-

Keterangan: Rata-rata dari tiga ulangan ± standar deviasi; HSI = Hari Setelah Inokulasi; SD = Standar Deviasi.

dan BAP. Hasilnya menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi 2,4-D semakin kompak kalus yang terbentuk.

Kalus yang terbentuk dari suatu eksplan dapat memunculkan warna yang berbeda-beda. Warna kalus mengalami perkembangan sejak seminggu setelah inokulasi hingga berumur 60 hari setelah inokulasi. Setelah inokulasi hampir semua kalus pada perlakuan masih segar dan berwarna *light yellowish green* (150D) atau hijau kekuningan terang. Kemudian warna pada kalus ini berubah sesuai perkembangan kalus pada setiap perlakuan. Pada akhir pengamatan, warna kalus didominasi oleh warna hijau kekuningan terang/cerah (*light yellowish green* 150D) pada berbagai perlakuan.

Saat Inisiasi, Jumlah, dan Panjang Organ

Eksplan yang mampu membentuk organ berupa tunas, akar dan daun hanya diperoleh pada perlakuan media tanpa penambahan 2,4-D. Perlakuan yang mampu membentuk akar serta rambut-rambut akar hanya pada 3 perlakuan yaitu, perlakuan A0B0, A0B1, dan A0B2. Inisiasi akar tercepat adalah pada perlakuan 2,4-D 0 ppm + BAP 0 ppm yaitu 9 HSI. Pembentukan organ dapat dilihat pada Tabel 6. Bakti (2005), pada penelitiannya tentang embriogenesis somatik jahe pada beberapa ZPT menemukan bahwa akar keluar dari satu butiran kalus dan mempunyai bulu-bulu akar namun belum berhasil membentuk tunas. Perlakuan tanpa ZPT membentuk organ diduga karena kalus proembrio yang telah terbentuk

berkembang ke tahap selanjutnya yaitu pendewasaan dan perkecambahan sehingga berhasil membentuk planlet utuh yang lengkap. Kemampuan regenerasi eksplan dalam media dengan kadar 2,4-D 0 ppm didukung oleh pernyataan Abdillah (2013) bahwa pada tahap pendewasaan digunakan ZPT pada konsen-trasi rendah atau tidak mengandung ZPT sama sekali. Menurut Tahardi dan Mardiana (1995), penambahan auksin dan sitokinin selama 2-4 minggu cukup optimum bagi pembentukan embrioid dan embrioid ini akan berkembang dan berdiferensiasi lebih lanjut apabila auksin dihilangkan dari media.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa pemberian 2,4-D yang cukup tinggi mampu mengurangi penggunaan BAP pada media dan menghasilkan induksi dan proliferasi kalus yang optimal. Perlakuan 2,4-D 2 ppm dengan BAP 0 ppm mampu menghasilkan kalus yang baik, banyak, inisiasi yang cepat dan efisien (optimal). Perlakuan 2,4-D 2 ppm + BAP 0 ppm menghasilkan kalus yang banyak yaitu 26,18 mg dan persentase kalus yang tinggi yaitu 100%. Media MS dengan penambahan 2,4-D tanpa BAP mampu membentuk kalus yang remah dan embriogenik. Media MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh BAP tanpa 2,4-D mampu meregenerasikan kalus embriogenik dan membentuk akar. Tunas

dan daun terbentuk pada media kontrol (2,4-D 0 ppm + BAP 0 ppm).

DAFTAR PUSTAKA

- Abdillah, R.H. 2013.** Makalah Seminar "Pemanfaatan Embriogenesis Somatik dalam Usaha Penyediaan Bibit Tanaman Obat. FP UGM. Yogyakarta.
- Ariati, S.N., Waeniati, Muslimin dan I.N. Suwastika. 2012.** Induksi Kalus Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.) pada Media MS dengan Penambahan 2,4-D, BAP dan Air Kelapa. *J. Natural Sciences*. 1 (1): 74-84.
- Bakti, C. 2005.** Embriogenesis Somatik Jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) Pada Berbagai Zat Pengatur Tumbuh. Tesis. Pascasarjana IPB. Bogor.
- Damayanti, F., Murdaningsih H.K., T. Herawati dan J.S. Darsa. 2005.** Tanggap Eksplan Batang Tiga Kultivar Lili terhadap Kombinasi BA dengan Beberapa Taraf 2,4-D pada Medium MS. *Zuriat*. 16 (1): 60-66.
- Djajanegara, I.N. dan A. Zatinika. 1996.** Inisiasi dan Optimasi Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh 2,4-D dalam Kultur Sel Kunyit (*Curcuma domestica* Val.). Majalah BPPT. 7 (1): 111-114.
- Dodds, J.H. & Roberts, L.W. 1984.** Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press. Cambridge.
- Fauza, H., Sepriyanto dan A. Nurdin. 2004.** Pengaruh Beberapa Konsentrasi 2,4-D terhadap Pembentukan Kalus Jahe in vitro. *J. Sigma* 12 (1): 73-80.
- George, E.F. 1993.** Plant Propagation by Tissue Culture, 2nd Edition. Exegetic Limited. England.
- Gultom, M.S., N. Anna dan E.B.M. Siregar. 2013.** Respon Eksplan Biji Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk.) terhadap Pemberian IAA secara In Vitro. *J. Buletin Littro* 20 (2) : 131-140.
- Kristina, N.N., R. Noveriza, S.F. Syahid dan M. Rizal. 2008.** Peluang Peningkatan Kadar Kurkumin Pada Tanaman Kunyit Dan Temulawak. Badan Litbang Pertanian. *Balittro*-Bogor 9 (2) : 12-17.
- Lizawati. 2012.** Induksi Kalus Embriogenik dari Eksplan Tunas Apikal Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) dengan Penggunaan 2,4-D dan TDZ. *Menara Perkebunan FP Universitas Jambi* 1(2): 75-87.
- Pitasawat, B., W. Choochote, B. Tuetun, P. Tippawangkosol, D. Kanjanapothi, A. Jitpakdi dan D. Riyong. 2003.** Repellency of Aromatic Turmeric *Curcuma aromatica* Under Laboratory and Field Conditions. *J. of Vector* 28(2) : 234-240.
- Pribadi, E.R. 2009.** Pasokan dan Permintaan Tanaman Obat Indonesia Serta Arah Penelitian dan Pengembangannya. *Perspektif*. 8 (1):52-64.
- Raharjo, M dan O. Rostiana, 2003.** Standar Prosedur Operasional Budidaya Temulawak. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. *Balittro. J. Littri*. Bogor. 13(2):33-38.
- Rismayani, Hamzah F. 2010.** Pengaruh Pemberian Chlorox (NaOCl) pada Sterilisasi Permukaan untuk Perkembangan Bibit Aglaonema (*Donna carmen*) Secara In Vitro. Prosiding Seminar Ilmiah dan Pertemuan Tahunan PEJ dan PFJ XX Komisariat Daerah Sulawesi Selatan.
- Rostiana, O., dan S.F. Syahid. 2008.** Embriogenesis somatik Jahe dari Eksplan Meristem. *J. Biotrop* 15 (2): 12-24.
- Seswita, D. 2010.** Penggunaan Air Kelapa Sebagai Zat Pengatur Tumbuh pada Multiplikasi Tunas Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) In Vitro. *J. Littri* 16 (4) : 135-140.
- Siti, D.H.Hoesen, Witjaksono dan L.A Sukanto. 2008.** Induksi Kalus dan Organogenesis Kultur In Vitro *Dendrobium lineale* Rolfe. *J. Berita Biologi* 9 (3) : 333-342.
- Sitinjak, R.R., O. Rostiana, Karyono dan T. Supriatun. 2006.** Pengaruh 2,4-D

- dan BA Terhadap Induksi Kalus Embriogenik Pada Kultur Meristem Jahe (*Zingiber officinale* Rosc.). 8 (2) : 115-120.
- Tahardi, J.S. dan Mardiana N. 1995.** Cocoa Regeneration via Somatic Embriogenesis. *J. Menara Perkebunan*. 52(3): 174-178.
- Wardiyati, T., Y. Rinanto, T. Sunarni dan Azizah. 2008.** Eksplorasi Dan Identifikasi Kunyit (*C. domestica*) Dan Temulawak (*C. Xanthorrhiza* Roxb.) Di Jawa Dan Madura. *J. Ilmu-Ilmu Hayati*. 20(2) : 159-164.
- Yuanti, A.M. 2004.** Studi Kombinasi Macam Auksin dan Benzyladenin Pada Pembentukan Kalus Temu Putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.). *J. Produksi Tanaman*. 8(3) : 30-37.
- Yelnitis. 2012.** Pembentukan Kalus Remah dari Eksplan Daun Ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq) Kurz.). *J. Pemuliaan Tanaman Hutan*. 6(3): 181-194.
- Yelnitis dan T.E. Komar. 2010.** Upaya Induksi Kalus Embriogenik dari Potongan Daun Ramin. *Indonesia's Work Programme for 2008 ITTO CITES Project dan PPPHA Badan Litbang Kehutanan*. Bogor.